

**ACADEMIA DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS, QUIMICAS  
Y NATURALES DE ZARAGOZA**

**La micropropagación y la mejora  
de especies frutales**

DISCURSO DE INGRESO LEIDO POR EL ACADEMICO ELECTO

**Ilmo. Sr. D. JUAN ANTONIO MARIN VELAZQUEZ**

EN EL ACTO DE SU RECEPCION SOLEMNE  
CELEBRADO EL DIA 10 DE ABRIL DE 1997

Y

DISCURSO DE CONTESTACION POR EL

**Excmo. Sr. D. HORACIO MARCO MOLL**

PRESIDENTE DE LA ACADEMIA



ZARAGOZA

1997

Depósito legal: Z. 973 - 1997

*Imprime:*

Sdad. Coop. de Artes Gráficas  
LIBRERIA GENERAL  
Pedro Cerbuna, 23  
50009 Zaragoza

**LA MICROPROPAGACION Y LA MEJORA  
DE ESPECIES FRUTALES**

**POR EL**

**Ilmo. Sr. D. JUAN ANTONIO MARIN VELAZQUEZ**

## ÍNDICE

<b>Dr. RAMÓN ESTERUELAS ROLANDO</b>	9
<b>LA MICROPROPAGACIÓN Y LA MEJORA DE ESPECIES FRUTALES</b>	11
APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> A LA MEJORA DE ESPECIES FRUTALES	11
MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES FRUTALES	14
FASES DE LA MICROPROPAGACIÓN	17
I. establecimiento del cultivo	17
II. multiplicación de propágulos	17
III. restablecimiento de las plantas a suelo	18
VENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN	22
LIMITACIONES DE LA MICROPROPAGACIÓN	23
ENRAIZAMIENTO <i>IN VITRO</i> DE ARBOLES FRUTALES	26
FASES DEL ENRAIZAMIENTO	29
Divisiones basadas en la potencialidad celular	29
Divisiones basadas en el tratamiento y la respuesta	30
Inducción	30
Iniciación	31
Crecimiento	31
APLICACIÓN COMERCIAL DE LA MICROPROPAGACIÓN	32
PERSPECTIVAS	33
BIBLIOGRAFÍA	35

Excmo. Sr. Presidente,

Ilmos. Sres. Académicos,

Señoras y Señores:

Quiero mostrar mi gratitud al Sr. Presidente y a todos los Señores Académicos por el honor que me conceden al elegirme Académico numerario de esta docta Corporación. Es un honor que me estimulará para hacerme digno merecedor de tal distinción en el campo de mi actividad científica. Actividad que inicié en la Facultad de Ciencias de esta Universidad, en el desaparecido Departamento de Biología, dirigido por el Dr. Cruz Rodríguez Muñoz, que me transmitió su entusiasmo por la Ciencia y sobre todo por la Biología, y me decidió a su estudio. Su memoria y su dedicación a sus alumnos y discípulos forman parte tanto de mi persona, como del espíritu de esta Universidad.

La siguiente reseña del Académico que me antecedió en esta Academia, va a resumir la incansable actividad creadora y científica que siempre tuvo presente la necesidad de ligar la investigación al mundo agrario para su modernización y desarrollo adecuados.

### **Dr. RAMÓN ESTERUELAS ROLANDO**

Fue un zaragozano, natural de Biota, que nació a principios de siglo, en 1907, y que vivió una larga y fructífera vida, falleciendo en julio de 1994. Era Doctor Ingeniero Agrónomo por Madrid y Diplomado en Economía y Agronomía por Montpellier. Gaeste Lektor de la Universidad de Aarhus y Pensionado en el Laboratorio Calsberg de Copenhague. También fue Capitán de Complemento del Cuerpo de Ingenieros Aeronáuticos. Tuvo una intensa actividad en la Administración Central ocupando, entre otros, el cargo de Director General de Agricultura del Gobierno central, y el de Presidente de la Comisión de Agricultura que elaboró el II Plan de Desarrollo Económico y Social. Además fue Presidente de la Junta Central del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias y de la Junta del Instituto Nacional para la Producción de Semillas Selectas, así como de los Servicios Nacionales del cultivo del tabaco y del algodón. Fue Vocal del Consejo del Banco de Crédito Agrícola y del Fondo de

Orientación y Regulación de Precios y Producciones Agrarias. Fue Consejero de número del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Presidente del Patronato Alonso de Herrera y de la División de Ciencias Médicas y de la Naturaleza de dicho Organismo.

Su actividad también tuvo lugar en el ámbito internacional. Entre otras actividades, fue representante permanente de España en el sector agrícola de la OCDE, Presidente del Comité de Agricultura de la OCDE y Vocal del Comité de Cooperación Técnica. Agregado Agrónomo en la Embajada de España en París y Presidente del Comité Agrícola franco-español de la Cámara Agrícola hispano-francesa, cuya creación propuso. Fue miembro de la Comisión Española negociadora con la Comunidad Económica Europea. Redactó el proyecto de creación del Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM, París), organismo creado bajo los auspicios de la OCDE y del Consejo de Europa con la colaboración de la FAO y de la CEE, y Presidente del Consejo de Administración y Delegado Permanente de España. Fue nombrado Académico de número de la Academia de Agricultura de Francia.

Pero le recordamos especialmente, además de por el importante papel en el impulso y desarrollo de obras hidráulicas y de regadíos en Aragón que se le reconoce, y por ser Vocal de la Comisión del Área Metropolitana y autor, en colaboración, del proyecto del Aeropuerto Civil de Zaragoza, y Director de las obras del mismo, por su actividad científica, haciendo de nuestra tierra la sede de centros de investigación que han sido, y son, referencia obligada en Ciencias Agrarias. Fue fundador y primer Director de la Estación Experimental de Aula Dei, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en Zaragoza, y germen de lo que actualmente se conoce como Campus de Aula Dei, que es una de las áreas de investigación y formación en agricultura más importantes, y que está formada, además, por el Centro de Investigación y Desarrollo Agrario del Ebro dependiente del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (actualmente Servicio de Investigación Agraria de la Diputación General de Aragón), del que fue fundador, y por el Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza, del Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM), cuya instalación por el Acuerdo de Asociación España-CIHEAM propuso y firmó. Perteneció, como miembro destacado, a la Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza y recibió múltiples

premios y condecoraciones en vida por su actividad en el campo de la investigación agraria, como la Gran Cruz de la Orden del Mérito Civil, la Gran Cruz de la Orden de Alfonso X el Sabio, la Gran Cruz y Encomienda de Número de la Orden Civil del Mérito Agrícola, Comendador de Número de la Orden del Mérito Agrícola en Francia, la Cruz Especial del Mérito Agrícola en Bélgica, la Medalla de Oro de la Universidad de Bari, la Insignia de Oro de la FIMA, la Cruz de Guerra, Dos Cruces rojas del Mérito Militar, Detalla de Campaña o la Cruz de Caballero de la Orden de la Legión de Honor de la República Francesa.

## **LA MICROPROPAGACIÓN Y LA MEJORA DE ESPECIES FRUTALES**

### **APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO* A LA MEJORA DE ESPECIES FRUTALES**

Las especies frutales tienen unas características que las separan de las demás especies cultivadas. Están formadas por plantas perennes que son propagadas vegetativamente. Suelen alcanzar gran tamaño, tener periodos juveniles largos, reposo invernal y un periodo productivo prolongado, y con pocas excepciones, como la fresa o el plátano, son leñosas.

Muchas tienen polinización cruzada por ser autoincompatibles, y son altamente heterocigóticas, siendo algunas especies, híbridos interespecíficos y poliploides complejos, por lo que se propagan vegetativamente para evitar que la recombinación genética, inevitable en los cruzamientos sexuales, desestabilicen las combinaciones de caracteres obtenidas mediante la selección.

La mayoría de las variedades frutales ha sido cultivada desde el Neolítico, siendo transformadas por selección continua, alejándose considerablemente de las características de sus progenitores. Las deficiencias inherentes a estos genotipos, seleccionados por determinados caracteres como la calidad del fruto, en detrimento de los restantes, han sido resueltas, en muchos casos, mediante el desarrollo de técnicas culturales como el uso de portainjertos, el control de insectos o enfermedades con pesticidas químicos, la utilización de reguladores de crecimiento, o las técnicas de recolección y postcosecha.

El uso generalizado de portainjertos o patrones bien adaptados, que permite utilizar las variedades productoras de fruta más interesantes, independientemente del tipo de suelo, plantea una situación compleja que ofrece nuevos aspectos en el cultivo y mejora de frutales: la propagación vegetativa de las variedades se realiza mediante injertos de yema sobre patrones compatibles, mientras, los patrones se propagan mediante estaquillado, u otras técnicas de propagación vegetativa, para preservar sus propiedades; la selección de los patrones debe cuidar, además de la facilidad de propagación, de la compatibilidad de injerto con las variedades de interés; el patrón, además de conferir resistencia a las condiciones adversas del suelo (deficiencias nutritivas o enfermedades y plagas del suelo, por ejemplo) puede modificar los hábitos de crecimiento y fructificación de la variedad adaptándolos a las necesidades de recolección y del mercado y modificando la calidad del fruto.

Muchas especies frutales tienen unos recursos genéticos muy reducidos como resultado de una selección muy intensa, combinada con la fijación de genotipos singulares por propagación clonal durante los últimos 10.000 años, y realizada por los fruticultores a partir de las poblaciones naturales. La industria frutal está basada en relativamente pocos genotipos que representan combinaciones únicas de caracteres. En muchos casos con gran resistencia al cambio de cultivares. Así, como indica Janick (1992) la industria del vino está basada en pocas variedades cultivadas que frecuentemente identifican el producto: los vinos 'Pinot Noir' y 'Cabernet Sauvignon' hacen referencia a clones específicos. La industria del dátil se basa en variedades de antigüedad bíblica. El cultivar predominante de peral en Europa, 'Barlett' o 'Williams', procede de una planta de semilla anterior a 1770. La reciente industria del kiwi está basada en un único clon pistilar, 'Hayward'. Por otro lado, sólo unas pocas especies frutales, como la fresa o el melocotonero, se caracterizan por una renovación constante de cultivares nuevos y mejorados obtenidos a través de programas de mejora convencional.

La mejora convencional es un sistema eficaz porque está basada en mecanismos evolutivos: la selección de genotipos superiores a partir de poblaciones con variabilidad genética obtenida con recombinación sexual, que pueden servir de base para subsiguientes ciclos de mejora. Sin embargo, hay restricciones para la mejora



convencional que inciden especialmente en las especies propagadas vegetativamente, con un largo ciclo vital, y que son resultado de un largo proceso de selección:

- 1) incapacidad de incorporar variación genética de especies no relacionadas mediante cruzamientos, o de incorporar pequeños cambios sin recombinación, lo que lleva a la pérdida de los caracteres que definen a un cultivar y lo hacen deseable,
- 2) baja variabilidad presente en las poblaciones naturales, junto a la acción del azar en las mutaciones inducidas, que generalmente son negativas y difíciles de estabilizar,
- 3) la limitación de la selección en detectar combinaciones poco frecuentes o extrañas, y
- 4) la dependencia a distintos factores: al tiempo de generar ciclos de recombinación; al espacio para cultivar las poblaciones necesarias para recuperar los recombinantes superiores; y a los recursos para ser capaz de seleccionar, identificar y evaluar las combinaciones deseables.

Nuevas estrategias derivadas de las técnicas de genética molecular y microbiana, como la selección celular, el rescate de embriones, la fusión de protoplastos y la tecnología del DNA recombinante, o la ingeniería genética, han llevado a una revolución biotecnológica. Todas ellas están basadas en el cultivo de células y tejidos. Estas técnicas han sido atractivas por ofrecer una vía para vencer las limitaciones que imponen los cruzamientos sexuales, permitiendo la introducción de genes extraños por diferentes vías: rescate de embriones, como en vid (Gray et al, 1990) y en melocotonero (Ramming, 1990) permitiendo obtener plantas de cruzamientos en los que se presentaba un aborto de embriones; fusión de protoplastos, como en la obtención de híbridos somáticos entre especies tan alejadas como un cerezo y un peral (Ochatt et al, 1989); o ingeniería genética, como en la transformación genética de la variedad de manzano 'Greensleeves' (James et al, 1989). Además de hacer posible la introducción de pequeños cambios, discretos y definidos, en genotipos establecidos vía variación somacional y selección celular, como en la obtención de resistencia al patógeno *Xanthomonas campestris* en melocotonero (Hammerschlag, 1988), o en la tolerancia a un estrés abiótico como la clorosis férrica en membrillero (Dolcet-Sanjuan et al, 1990), sin los efectos desestabilizadores de la recombinación. El uso de marcadores moleculares que ha permitido ya la identificación precoz del sexo de plantas de pistacho (Hormaza et al., 1994), acelerará los procesos con la selección

asistida, y ayudará en la selección de caracteres cuantitativos y permitirá la creación de mapas genéticos en especies en las que es difícil realizar análisis genéticos (Moore y Durham 1992). La tecnología del DNA recombinante también permite identificar clones (Nybom et al., 1990) con una gran precisión para la protección de las obtenciones vegetales.

Tras la selección de los clones mejorados, debe realizarse la selección sanitaria. Debe estudiarse el estado sanitario de estos clones respecto a enfermedades producidas por virus, y en caso de enfermedad debe realizarse el saneamiento mediante la eliminación de virus, viroides y fitoplasmas, y la obtención de clones sanos que puedan ser difundidos comercialmente. Las técnicas de cultivo *in vitro* han sido aplicadas con éxito en especies frutales para este fin eliminando virosis que no eran posibles de eliminar con las técnicas convencionales. Se han utilizado diversas técnicas de cultivo *in vitro*: el cultivo de meristemos (Boxus, 1984), microinjerto de ápices caulinares (Murashige et al., 1972), o la termoterapia *in vitro* (Stein et al., 1991), útil, sobretudo, cuando las plantas son sensibles a la temperatura.

La utilización de estas tecnologías está basada en la existencia de un método de regeneración *in vitro* de plantas completas, de su multiplicación y de su adaptación a condiciones exteriores. Este método, la micropropagación, o propagación mediante cultivo de tejidos se ha desarrollado en frutales a partir de los años 70 y es el ejemplo de aplicación comercial de una biotecnología más importante.

## MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES FRUTALES

La micropropagación es una técnica de propagación vegetativa basada en la capacidad que poseen las células vegetales de dividirse y de regenerar órganos y plantas enteras, cuando son sometidas a condiciones nutritivas y ambientales adecuadas y son estimuladas con determinados reguladores de crecimiento. Las características esenciales del método son:

1. Es una propagación vegetativa, es decir, sin participación de los órganos reproductores de la planta, por medio de la estimulación de la inducción de yemas

axilares que darán lugar a nuevos brotes que, una vez enraizados, formarán las nuevas plantas. Es una propagación masiva, ya que la formación de yemas puede ser estimulada en gran número y en corto espacio de tiempo. Además es una propagación clonal, ya que la formación de yemas axilares asegura la producción de plantas conformes genéticamente al tipo original.

2. *Es una propagación in vitro porque tiene lugar en frascos de cultivo (originalmente de vidrio, aunque actualmente se emplea el plástico cada vez más), y con medios de cultivo definidos en los que se controla la composición y concentración de sus componentes. Tiene lugar fuera del ambiente natural, en cámaras de cultivo donde son controladas las condiciones ambientales (luz, temperatura, humedad relativa) que se mantienen a unos niveles óptimos para el crecimiento.*

3. *Se mantienen las condiciones asépticas en todas las manipulaciones, evitando las contaminaciones por hongos o bacterias que proliferarían con rapidez en el medio de cultivo afectando negativamente al cultivo de tejidos. Para ello es esencial la esterilización del material vegetal y de los frascos y medios de cultivo.*

Los estudios sobre el cultivo *in vitro* de especies frutales se han desarrollado ininterrumpidamente desde hace más de veinte años, pero ha sido durante la última década cuando se han obtenido los avances técnicos más espectaculares, como el cultivo de protoplastos y posterior regeneración de plantas y la obtención de plantas manipuladas genéticamente. Por otra parte, las técnicas se han adaptado para la aplicación comercial de la micropropagación. En plantas herbáceas los estudios fueron iniciados hace más de cuarenta años, estando más avanzados que en los frutales debido a sus características: plantas leñosas, de crecimiento lento, con necesidad de reposo invernal y de ciclo vegetativo largo, que en conjunto componen una situación más complicada. Los árboles frutales, generalmente, son combinaciones de una variedad, seleccionada por su fruto, y un portainjertos o patrón, seleccionado por la adaptación al suelo y por el porte que da al árbol. Como las variedades se propagan vegetativamente por injerto de yema, la micropropagación tendrá aplicación principalmente en el caso

de los patrones, generalmente propagados por técnicas tradicionales como el estaquillado.

*Factores ambientales.* Los cultivos de tejidos vegetales deben mantenerse en unas condiciones ambientales apropiadas para su mantenimiento, tratando de reproducir las condiciones naturales más favorables. La luz, la temperatura y la humedad relativa son los factores ambientales más importantes. La luz interesa en distintos aspectos: la intensidad, el fotoperiodo y la calidad espectral. La luz es necesaria, no tanto para la fotosíntesis de los tejidos que, si se produce, es en muy baja proporción, sino para que la fotomorfogénesis tenga lugar y se produzcan brotes de aspecto normal. Los cultivos sometidos a intensidades de luz muy altas o muy bajas no muestran buen crecimiento. Intensidades de 1000 a 3000 lux (unos  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) son suficientes para un desarrollo normal. El fotoperiodo es importante en las especies frutales ya que responden a los cambios de duración del día con el crecimiento (primavera) o el reposo (otoño), así que para el cultivo *in vitro* es conveniente proporcionar luz durante largos periodos (fotoperiodo de día largo), generalmente de 16 horas. Aunque la calidad de la luz puede determinar diferentes respuestas morfogénicas por medio del fitocromo, la experiencia demuestra que la luz de tubos fluorescentes de luz blanca (cool white), pobre en longitudes de onda larga, es suficiente para obtener buenos crecimientos. La temperatura se regula en torno a los 22-25 grados centígrados, pero durante el periodo iluminado, en el interior de los frascos de cultivo es ligeramente superior (1-2 grados) debido al efecto invernadero, creando un termoperiodo suave aun manteniendo la temperatura constante en la cámara de cultivo. En el interior de los frascos de cultivo se mantiene una alta humedad relativa, cercana a la saturación, debido a las condiciones de estanqueidad casi total necesarias para mantener la asepsia, y que sólo permiten un cierto intercambio gaseoso, creando un ambiente favorable para el crecimiento y la multiplicación de los brotes, aunque después deban sufrir adaptaciones para poder ser trasplantadas al exterior.

*Factores nutritivos.* Los nutrientes y reguladores de crecimiento se suministran a través del medio de cultivo, solidificado con agar para servir de soporte que mantenga la polaridad y la aireación de los tejidos, y que permita la absorción de agua y

nutrientes. El medio de cultivo se compone de sales minerales y de compuestos orgánicos. Las sales minerales están representadas en distintas proporciones según estén formadas por macro o microelementos y contienen todos los elementos esenciales. Se han descrito numerosas formulaciones adaptadas para casos concretos, no existiendo un medio único ideal. El más utilizado es el descrito por Murashige y Skoog (MS) en 1962 con una concentración relativamente alta de sales que provoca crecimientos rápidos en la mayoría de los cultivos. Sin embargo, se han descrito modificaciones adaptadas para plantas leñosas que mejoran el crecimiento como los descritos por Quoirin y Lepoivre (1977) o el "woody plant medium" (WPM) por Lloyd y McCown en 1980. Los compuestos orgánicos que se incluyen en un medio de cultivo son numerosos y pertenecen a distintos grupos: vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento. Las vitaminas son necesarias *in vitro*, principalmente algunas del grupo B. La tiamina y el inositol son esenciales para un crecimiento normal, además, se suele añadir piridoxina, ácido nicotínico y un aminoácido, glicina. La sacarosa está presente en gran concentración (30 g/l) porque sirve de fuente de energía y de carbono. Los reguladores de crecimiento presentes en los medios de cultivo, pertenecen a dos grupos principales: auxinas y citoquininas, y ocasionalmente también se encuentra el ácido giberélico. La diferenciación de un tejido *in vitro* está regulada por el equilibrio entre auxinas y citoquininas, de manera que si predominan las auxinas se forman raíces, y si predominan las citoquininas se forman yemas que darán lugar a brotes. Los reguladores de crecimiento más utilizados son el ácido indolbutírico (IBA), una auxina, y la benziladenina (BA), una citoquinina.

#### FASES DE LA MICROPROPAGACIÓN

Los principios básicos de la técnica de la micropropagación son iguales en los diferentes tipos de plantas, y fueron descritos acertadamente por Murashige (1974) en un esquema, ya clásico, que consta de tres fases diferenciadas, con requerimientos nutritivos, hormonales y ambientales diferentes:

- I. establecimiento del cultivo
- II. multiplicación de propágulos

### III. restablecimiento de las plantas a suelo

I. *Establecimiento in vitro*. El inicio del cultivo es una fase muy delicada en la que la porción de tejido vegetal que sirve de inóculo (explanto) debe sobrevivir al aislamiento del resto de la planta original y comenzar el crecimiento *in vitro*. El medio de cultivo debe proporcionar al explanto todo lo que necesita para vivir y desarrollarse: nutrientes (sales minerales y compuestos orgánicos como azúcares y vitaminas) y reguladores de crecimiento que estimulen su desarrollo. Dos factores son particularmente importantes en el establecimiento del cultivo: el explanto y la esterilización.

Explanto. La elección del tipo de explanto puede ser determinante para el éxito del establecimiento del cultivo. En la micropropagación de frutales, los más adecuados son los ápices de tallo y las yemas axilares, en los que los meristemos apicales mantienen las características genéticas de la planta original y son capaces de continuar su crecimiento. Otro aspecto importante es el tamaño, es decir, la cantidad de tejidos que acompañan al meristemo y que juegan un papel nutritivo y de protección a los tejidos meristemáticos. Pero cuanto mayor sea el explanto, mayores posibilidades de introducir bacterias o esporas de hongos existentes en la planta original, aunque también es mayor la probabilidad de supervivencia por lo que hay que tomar una decisión de compromiso. Habitualmente se toman yemas apicales y nudos de ramas con una yema axilar, o yemas aisladas en las que por disección se eliminan los catafilos exteriores y se dejan unos pocos esbozos foliares. En el caso de que el objetivo sea la eliminación de enfermedades viróticas, es necesario reducir el tamaño a 0.1-0.5 mm para asegurarnos de tomar sólo tejidos meristemáticos libres de virus, por lo que las dificultades técnicas para la supervivencia del explanto aumentan considerablemente. Además, hay que considerar el estado de la planta origen, no sólo de su estado sanitario, sino del grado de desarrollo (juvenil o adulto) y de crecimiento (reposo o crecimiento activo). Es aconsejable partir de plantas pre-acondicionadas, en crecimiento activo bajo condiciones de invernadero o cámara, en las que podamos conocer la "historia" reciente de la planta y situarla en las mejores condiciones. A este acondicionamiento de las plantas se le ha denominado también fase 0 de la micropropagación.

Esterilización. Una vez tomados los explantos y antes de ser introducidos en el medio de cultivo hay que eliminar todas las esporas de hongos y bacterias que tienen en su superficie. El grado de esterilización necesario dependerá del estado de la planta origen. Si partimos de plantas crecidas en el exterior, la presencia de gérmenes será mayor que si se han cultivado en invernadero, con cuidados como el no mojar la parte aérea al regar y con tratamientos fitosanitarios adecuados. En cualquier caso, la humedad siempre favorece el desarrollo de hongos que posteriormente afectarán al cultivo.

Un procedimiento habitual para desinfectar el material tomado de las plantas origen consiste en el lavado en agua corriente (30 min a una hora) seguido de inmersión en una solución de hipoclorito cálcico o sódico (lejía) durante 20-40 min (según el material) con una concentración de cloro activo de 5 g/l a la que se añade unas gotas de un agente humectante (Tween 20) para reforzar su acción frente a la capa de ceras y cutícula de la epidermis. El resto de las manipulaciones (los aclarados y la introducción del explanto en el medio) han de desarrollarse en la cabina de flujo laminar en condiciones asépticas. Tras la desinfección con hipoclorito hay que aclarar con abundante agua destilada estéril (3 a 5 baños) para eliminar los restos y evitar que dañen más al explanto, suprimir las partes dañadas con un bisturí reduciendo el explanto al tamaño deseado y por fin introducirlo en un tubo de ensayo con medio de cultivo, conservando la polaridad (parte apical hacia arriba), de forma que no quede totalmente cubierto por el medio. A veces es útil sumergir el material en etanol durante 10-30 segundos, antes de la inmersión en hipoclorito, para disolver las ceras cuticulares y permitir la acción posterior del cloro sobre la superficie. Otras sustancias germicidas, como el cloruro de mercurio, se utilizan poco debido a su toxicidad. El uso de antibióticos raramente elimina las bacterias, aunque sí que detiene su crecimiento, siendo más eficaz la mezcla de varios, sin que alcancen concentraciones tóxicas. A pesar de su baja efectividad, el uso de antibióticos está indicado en el caso de contaminaciones latentes (que pueden tardar en aparecer largos periodos de tiempo) o cuando las bacterias ya ocupaban el interior de la planta origen y no se dispone de otra fuente.

Es aconsejable el uso de medios enriquecidos, apropiados para el desarrollo de bacterias y hongos, para asegurarse de la esterilidad de un cultivo, puesto que algunos microorganismos tardan cierto tiempo en adaptarse a los medios de cultivo utilizados antes de crecer exponencialmente.

II. *Multiplicación de propágulos.* La fase del establecimiento del cultivo termina cuando logramos tener cultivos en crecimiento. Entonces es preciso estimular la inducción de yemas que, al crecer, formen nuevos brotes. Estos brotes (propágulos) pueden ser separados y colocados en frascos con medio de cultivo nuevo en cada subcultivo. Al repetir el proceso indefinidamente se obtiene una rápida multiplicación del número inicial de brotes, teóricamente según una progresión geométrica. Dos aspectos principales afectan a la multiplicación: el tipo de yemas inducidas y los subcultivos. Según la concentración y el tipo de reguladores del crecimiento (principalmente citoquininas) y el explanto utilizado, podemos inducir dos tipos de yemas: axilares, que provienen de meristemas preexistentes derivados del meristemo apical, estables genéticamente, y que conservan la conformidad genética con la planta origen; y adventicias, derivadas de tejidos somáticos, principalmente de tejidos desorganizados (callo), y que no son estables genéticamente, pudiendo obtener aberraciones que den lugar a variabilidad genética, no deseada en la propagación clonal. La formación de yemas adventicias puede aumentar sensiblemente el factor de multiplicación respecto a las axilares, ya que no está limitada a la existencia de un tejido determinado, pero debe evitarse para asegurar la conformidad de las plantas regeneradas. Según el hábito de crecimiento *in vitro*, pueden realizarse dos tipos de multiplicación axilar: secciones nodales, es decir, cortando los nudos de los brotes con una yema axilar que dará lugar a un nuevo brote cada uno; o por ramificación axilar mejorada, cuando por la técnica de división y por los reguladores de crecimiento utilizados, se suprime la dominancia apical y se provoca la aparición de numerosos brotes axilares, que pueden ser separados individualmente o por grupos.

Cada cierto tiempo es necesario realizar subcultivos, ya que los brotes crecen y ocupan el espacio del frasco de cultivo, a la vez que agotan los nutrientes del medio y acumulan en él sustancias de desecho y exudados que pueden resultar inhibidores o provocar el envejecimiento del cultivo. Para mantener la tasa de crecimiento y



multiplicación es necesario pasar los nuevos explantos, separados de sus cultivos, a medio reciente. El periodo de tiempo mínimo entre dos subcultivos (generalmente un mes) y el tipo de manipulación realizada en el material en cultivo (separar brotes o nudos con una yema axilar) afectan a los resultados de la multiplicación.

III. *Restablecimiento de las plantas a suelo.* Una vez obtenidos los brotes necesarios en la fase de multiplicación, debemos prepararlos para el trasplante a suelo y adaptarlos al ambiente exterior. Si los brotes no han alcanzado un tamaño que los haga manejables (unos 2 cm o más) deberá estimularse el crecimiento reduciendo la concentración de citoquinina en el medio. Además, será necesario provocar la aparición de raíces para regenerar la planta completa. El enraizamiento, que se tratará más tarde en detalle, puede realizarse *in vitro*, pasando los brotes individuales a un medio con alta concentración de una auxina (generalmente IBA a 1-3 mg/l) y sin citoquininas, durante un periodo corto de inducción de raíces, para ser pasados luego a otro de desarrollo sin reguladores de crecimiento. También es posible realizar el enraizamiento *in vivo*, fuera de los frascos de cultivo, tratando a los brotes como microestaquillas y aplicándoles tratamientos de auxinas, bien hundiendo la base en auxina en polvo, bien sumergiéndolas en una solución acuosa. Las ventajas del enraizamiento *in vivo* son evidentes, ya que se simplifica el método y disminuye el trabajo, las manipulaciones y el costo por planta. Independientemente del método de enraizamiento empleado, las plantas regeneradas deben sufrir un proceso de aclimatación que las adapte al ambiente exterior, con menor humedad relativa, mayor intensidad luminosa y pasando de un modo de nutrición heterótrofo a otro autótrofo. Durante este proceso, las plantas regeneradas son trasplantadas a túneles de plástico para la aclimatación en los que se mantiene una elevada humedad relativa para evitar la desecación, exponiéndolas diariamente a un ambiente con baja humedad relativa durante periodos de tiempo crecientes, permitiendo la recuperación de las plantas y estimulando las adaptaciones fisiológicas y anatómicas necesarias para controlar la pérdida de agua, como hemos estudiado en el patrón de cerezo 'Masto de Montañana' (Marín et al, 1988). Las plantas, que en los frascos de cultivo adquieren una estructura de plantas de sombra, desarrollan, al ser aclimatadas, adaptaciones a las nuevas condiciones ambientales, con mayor irradiación, menor humedad relativa y un cambio en el modo de nutrición,

pasando a ser plantas autótrofas. La pérdida de agua moderada y controlada que sufren durante el proceso de aclimatación estimula el transporte a través de las raíces y del xilema de agua a los tejidos foliares, compensando la pérdida sufrida, pero también estimula el crecimiento de nuevas hojas, que pueden ser observadas en un corto plazo de una semana. Esta funcionalidad de la nueva planta y de sus órganos, también está confirmada por las observaciones histológicas e histoquímicas. En un plazo de 3 a 6 semanas las plantas pueden crecer sin protección en un invernadero y posteriormente pasar un temporada breve en umbráculo antes de ser trasplantadas a cajonera o vivero.

Las plantas micropropagadas son idénticas a las propagadas por métodos convencionales, y actualmente se están comercializando una importante cantidad de patrones frutales micropropagados ya que presentan ventajas, frente a los métodos convencionales, y frente a la micropropagación de las variedades y su cultivo sobre sus propias raíces (Zimmerman y Steffens, 1995). Sin embargo faltan estudios que indiquen si el comportamiento en campo de estos patrones micropropagados una vez injertados, es conforme al tipo propagado de forma convencional. Estos estudios son necesariamente largos. Algunos ensayos han mostrado sólo ligeras diferencias en vigor (Navatel y Bourrain, 1994), aunque sí que aumentan, con el cultivo *in vitro*, la producción de sierpes y de "burrknots" (esbozos de raíces aéreas) que no son deseables (Webster y Jones, 1989, 1992), por lo que no siempre es aconsejable el uso de patrones micropropagados (Webster, 1995).

#### VENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación puede emplearse en los casos en que es necesaria una propagación clonal. Pero requiere una alta cualificación técnica y costosas instalaciones, por lo que es más adecuada en los casos en que las técnicas tradicionales, más baratas, no son eficaces. La micropropagación está indicada en los siguientes casos:

- cuando los métodos convencionales son lentos, no convenientes, o imposibles,
- cuando es necesaria una rápida multiplicación de genotipos seleccionados, o

- cuando es necesaria la producción de plantas libres de patógenos y la termoterapia no es aplicable.

Además, presenta unos aspectos positivos:

- Miniaturización, ahorro de espacio, costes, labores. Las plantas cultivadas *in vitro* tienen un tamaño reducido, por lo que pueden cultivarse con una gran densidad, centenares de plantas por metro cuadrado de estantería, lo que supone un ahorro de espacio, de superficie de viveros, de costes de mantenimiento y de labores.

- Mantenimiento del cultivo en condiciones asépticas, y con garantía de mantenimiento del estado sanitario de las plantas durante su cultivo *in vitro*.

- Producción durante todo el año, al ser controladas las condiciones ambientales, aunque es necesario ajustar el trasplante a vivero desde el invernadero a la época adecuada.

- Intercambio a través de fronteras, facilitado por la miniaturización y por el control de las condiciones sanitarias.

#### LIMITACIONES DE LA MICROPROPAGACIÓN

La experiencia de la micropropagación demuestra que se plantean unos problemas específicos en cada fase que limitan los potenciales resultados espectaculares.

*Limitaciones en el establecimiento del cultivo.* Durante la etapa inicial los explantos deben adaptarse, tras el aislamiento y manipulación traumáticos, a la nutrición a través de un medio de cultivo que ha sido desarrollado empíricamente, por lo que en este proceso podemos reconocer los siguientes problemas:

- Crecimiento lento o "cero", debido posiblemente a una inadecuación del medio a los requerimientos nutritivos o a un estado fisiológico de la planta origen desfavorable.

- Contaminación del cultivo, bien por una desinfección superficial insuficiente, bien por la existencia de bacterias internas o latentes, que en los casos en que las

plantas origen no pueden preacondicionarse o cambiarse por otras en mejor estado, solo pueden atenuarse con el uso de mezclas de antibióticos.

- Exudados que oscurecen el medio, debidos a la producción y liberación de compuestos fenólicos como respuesta a las heridas y al proceso de esterilización, que a veces son controlados con la adición de compuestos antioxidantes, como el ácido ascórbico y el ácido cítrico, o por la elección de una época de inicio del cultivo más adecuada.

- Vitrificación o hiperhidricidad de los tejidos, desorden fisiológico que reduce el crecimiento y multiplicación de los brotes, de origen complejo y difícil de predecir. Es reversible durante las fases iniciales si se cambian los brotes a medios con mayor concentración de agar o con menor concentración de citoquininas.

*Limitaciones en la fase de multiplicación.* Las posibilidades teóricas predicen una multiplicación de los brotes según una progresión geométrica, cuya única limitación sería la falta de capacidad para manejar un número muy elevado de cultivos. Veamos unos números: partiendo de un único brote y suponiendo una tasa de multiplicación muy moderada de 3 (tres brotes por brote cada subcultivo, o cada mes) tendremos una progresión geométrica de razón 3 (1, 3, 9, 27, ...) que supone al cabo de un año obtener más de 530,000 brotes, o unos 59,000 frascos de cultivo (con 9 brotes cada uno), que ocuparían una superficie de estanterías de 378 m<sup>2</sup>, o suponiendo estantes de 80 cm de fondo, supondrían 470 m lineales de estantería, y tanto la cantidad de brotes, como la capacidad de la cámara de cultivo serían enormes y difícilmente imaginables en un laboratorio comercial. De todas formas, no hay que olvidar que el mismo número de plantas, en un vivero convencional, ocuparían aproximadamente 1000 veces más superficie, ¡unas 37 hectáreas!. Pero si la tasa de multiplicación es la más realista de 5 (5 brotes por brote cada mes) y partiendo de un sólo brote, al cabo de un año trabajaríamos con más de 244 millones de brotes, o unos 27 millones de frascos de cultivo, que ocuparían una superficie de estanterías de unos 170,000 m<sup>2</sup>, o unos 217,000 m lineales de estanterías, lo que es totalmente desorbitado. Este ejemplo ilustra la potencialidad de la técnica, y explica cómo a pesar de los problemas que surgen en la aplicación a gran escala de la micropropagación, se obtengan resultados sorprendentes. Entre otros problemas que limitan la multiplicación se encuentran:

- Contaminaciones latentes, que pueden aparecer sincronizadas en los diferentes frascos de cultivo que no mostraban ningún signo aparente. Es posible conocer la existencia de estas contaminaciones en algunos casos que responden a medios enriquecidos en los que las bacterias latentes son forzadas a crecer rápidamente. Solo pueden controlarse por medio de mezclas de antibióticos, a determinar en cada caso.

- Vitrificación o hiperhidricidad de los tejidos, que puede ocasionar grandes pérdidas en la tasa de multiplicación.

- Variabilidad genética producida por la inducción de yemas adventicias, posiblemente debidas a una concentración excesiva de reguladores de crecimiento, una técnica defectuosa de separación de explantos en los subcultivos, o por cultivos mantenidos durante demasiado tiempo. Es difícil identificarla *in vitro* e incluso en invernadero, excepto en los casos más extremos, lo que indica la necesidad de ser cuidadoso con la aplicación de la técnica.

- Tasas de multiplicación irregular con un patrón estacional o no regular. Es posible que se deba a diferencias en la preparación de medios o a cambios en las condiciones de subcultivo o de la cámara de cultivo, por lo que es conveniente tomar nota de los cambios que se efectúan para relacionarlos posteriormente.

*Limitaciones en la fase de restablecimiento de las plantas a suelo.* El resultado final de la micropropagación es la obtención de plantas regeneradas y aclimatadas a condiciones *ex vitro* que supone una serie de cambios muy importantes: la diferenciación de raíces adventicias, la aclimatación a condiciones exteriores y el paso de la nutrición heterótrofa a la autótrofa, pudiendo aparecer problemas en cada uno de estos procesos:

- Bajos porcentajes de enraizamiento, que en especies difíciles todavía se desconoce la causa. El complejo metabolismo de la auxina, la existencia de una fase sensitiva y otra inhibidora y la interacción con el estado fisiológico de la microestaquilla pueden tener un papel importante.

- Producción de planta no utilizable, bien por tener poco tamaño y por lo tanto difícil de manipular, bien por ser de baja calidad, con pocas probabilidades de adaptarse durante la aclimatación.

- Bajo porcentaje de supervivencia en la aclimatación, que puede ser debido a una pérdida excesiva de agua (deseccación), o a una fotosíntesis insuficiente que no compense las pérdidas por respiración. Para evitar eso hay que partir de plantas de buena calidad, adquirir una técnica adecuada de aclimatación y aplicar los riegos y abonados necesarios.

- Infecciones y ataques de plagas tras el trasplante, quizá por utilizar un ambiente poco controlado sanitariamente.

- Parada vegetativa tras el trasplante. Es posible que se deba a necesitar pasar un periodo frío que estimule el crecimiento, o a tratamiento con auxinas a alta concentración.

#### ENRAIZAMIENTO IN VITRO DE ARBOLES FRUTALES

La regeneración de raíces adventicias para formar plantas completas supone para algunos frutales un punto crítico en su propagación vegetativa, incluso utilizando técnicas *in vitro*, por lo que se dedica un gran esfuerzo a su estudio (Puente y Marín, 1994) y lo describiremos, a continuación con más detalle.

El enraizamiento *in vitro* proporciona un modelo muy interesante para el estudio de este proceso, cuyo control permite la multiplicación vegetativa de plantas con baja capacidad de enraizamiento y su aplicación en horticultura, además de ser un proceso de regeneración de interés básico en el que tienen lugar fenómenos de dediferenciación celular y organización de promeristemas hasta la formación *de novo* de nuevos órganos.

El enraizamiento está influido por varios tipos de factores:

*Factores genéticos.* Los genotipos (especies y variedades) que enraízan más fácilmente en el campo también lo hacen *in vitro*. Por ejemplo, el patrón de manzano M.26, que enraíza bien en campo, produce raíces *in vitro* incluso en el medio de multiplicación de brotes cuya citoquinina generalmente inhibe el enraizamiento.

*Factores fisiológicos.* Aunque no está bien definido, el estado fisiológico en que se encuentra el brote es muy importante. Esta influido tanto por el origen del explanto como

por los subcultivos anteriores. Los explantos tomados de plantas jóvenes enraízan con más facilidad que los tomados de plantas adultas. El enraizamiento mejora al aumentar el número de subcultivos *in vitro*, dado que se produce un presunto rejuvenecimiento, también con la etiolación y con heridas basales. Por otra parte, el enraizamiento es perjudicado por una alteración fisiológica, la vitrificación, en la que los tejidos se vuelven hiperhidricos.

*Factores del medio.* La concentración de sales minerales o de algún elemento particular, como el boro, tienen influencia en el enraizamiento. Una concentración de las sales minerales reducida a la mitad o a la cuarta parte suele mejorar el enraizamiento. El boro es beneficioso para la rizogénesis y su concentración óptima depende de la auxina aplicada (Jarvis et al, 1984).

Fuentes de carbono. El enraizamiento necesita disponer de energía y materiales con los que formar las raíces. La sacarosa a una concentración de 30 g.l<sup>-1</sup>, proporciona ambas cosas, aunque a veces es conveniente reducirla a 20 ó 10 g.l<sup>-1</sup>. El sorbitol se usa frecuentemente en el manzano con ventaja (Pua y Chong, 1985), ya que es un producto de su fotosíntesis.

Suplementos orgánicos. Algunos fenoles en el medio de cultivo, especialmente el floriglucinol, estimulan el enraizamiento *in vitro* de algunos patrones en ciertas condiciones (Jones y Hatfield, 1976), pero la respuesta parece depender de las fases de crecimiento de la planta de la que se toma el explanto, de las variedades y clones, de la luz y la temperatura a la que se cultivan, de la edad del cultivo y del tiempo de exposición (James, 1983a; Webster y Jones, 1989; Welander y Huntrieser, 1981; Zimmerman, 1984; Zimmerman y Broome, 1981).

Agente pelificante y pH. Con frutales se suele usar un pH entre 5-5.8 y el medio se solidifica con agar (6-8 g/l). Pero en el medio de cultivo el pH disminuye con el tiempo y la actividad de los tejidos cultivados, encontrando una influencia notable de la acidificación del medio en la inhibición del enraizamiento, que se evita al estabilizar el pH con un tampón (Harbage y Stimart, 1996). El uso de medio líquido, con agitación, favorece la rizogénesis (Sriskandarajah y Mullins, 1981), pero disminuye la absorción de auxina, por

otra parte las plantas resultantes se vitrifican generalmente, siendo más difíciles de aclimatar (Hutchinson, 1984).

Reguladores de crecimiento. Las auxinas son los únicos reguladores de crecimiento que, estimulan el enraizamiento de forma consistente, manteniéndolas entre ciertos límites.

El ácido indol-3-acético (IAA) es la auxina presente en las plantas de forma natural, pero tiene un uso reducido debido a que es fácilmente destruida por el calor al esterilizar los medios y por la luz, prefiriéndose el ácido indol-3-butírico (IBA) y el ácido 1-naftalén-acético (NAA) (Nissen y Sutter, 1990). Otras auxinas de síntesis también se han utilizado con resultados variables.

Las aplicaciones de auxina durante todo el enraizamiento a 0.2-3 mg/l son poco utilizadas, ya que muchos patrones formaban abundante callo debido a la acción continuada de la auxina, especialmente con NAA. En su lugar se empezaron a aplicar tratamientos sólo durante los primeros 4-8 días a 2-3 mg/l, pasándolos después a un medio sin reguladores de crecimiento.

La adición de riboflavina (una vitamina que destruye la auxina sólo en presencia de la luz) permite reducir estas operaciones al permitir actuar a la auxina en la oscuridad durante el periodo de inducción, catalizando su fotodegradación posteriormente al exponer el cultivo a la luz, e impidiendo que se forme callo (Van der Krieken, et al, 1992)

La duración del tratamiento auxínico puede reducirse más sumergiendo la base de las microestaquillas en una solución muy concentrada de auxina (normalmente de 50-1000 mg/l) durante un tiempo corto (segundos a horas) y colocarlo luego en un medio sin reguladores de crecimiento (Lane y McDougald, 1982), indicando que el máximo efecto de las auxinas se produce en la primera fase, la de desdiferenciación.

Las citoquininas inhiben el enraizamiento, especialmente en la fase de diferenciación. En un trabajo clásico, Miller y Skoog (1953) demostraron que el cociente auxina/citoquinina es más importante que la concentración absoluta. Si este cociente es alto, se induce la formación de raíces, pero si es bajo se induce la formación de brotes.

La presencia de ácido abscísico es, a veces, inhibidor del enraizamiento (Pierik y Steegmans, 1975). La aplicación de giberelinas suelen inhibir el enraizamiento (Pawlicki y Welander, 1992), aunque parece depender de su concentración endógena previa. Y el



etileno actúa de forma compleja dependiendo del estado del brote, ya que, a veces, ha resultado estimulante y otras inhibidor del enraizamiento (Bollmark y Eliasson, 1990).

#### *Factores ambientales*

La temperatura comúnmente utilizada para el enraizamiento es cercana a 25°C, aunque en ciertos casos ha sido favorable una temperatura más alta (35 °C) (Zimmerman, 1984). Un termoperiodo que baje temperatura nocturna a 11-16°C manteniendo normal la diurna, ha sido beneficiosa en *Rosa* (Bressan et al, 1982).

La oscuridad al comienzo del enraizamiento (3-10 días) suele ser favorable (Zimmerman, 1984), pero el brote debe estar iluminado durante el resto del enraizamiento. La longitud de onda de la luz también juega un importante papel morfogénico, ya que el paso del fitocromo a la forma P<sub>fr</sub> por la luz roja estimula el enraizamiento (Rossi *et al.*, 1993).

#### FASES DEL ENRAIZAMIENTO

El enraizamiento es un proceso complejo que conviene estudiar en etapas o fases. Esto se justifica porque hay factores que ejercen efectos diferentes según el momento en que se aplican; además, también lo aconsejan los acontecimientos revelados por el estudio microscópico de la aparición de raíces, y por los cambios bioquímicos que tienen lugar. Pero se han hecho, desde antiguo, dos tipos de divisiones del proceso no coincidentes en la terminología: las que se basan en la potencialidad de las células que formarán las raíces, recogida actualmente por De Klerk y Ter Brugge (1992) y las que describen los tratamientos y las respuestas observadas, descritas de forma sencilla y fáciles de observar por Jarvis (1986).

##### a) Divisiones basadas en la potencialidad celular

- 1- desdiferenciación o meristemización de determinadas células diferenciadas y que pasan al estado meristemático como células isodiamétricas, pequeñas, con citoplasma denso y núcleo grande;
- 2- diferenciación en primordios radicales mediante la organización de las nuevas células formadas por división celular;

3- elongación de los primordios y emergencia hasta desgarrar los tejidos superficiales (cortical y epidérmico) de la estaquilla, mientras los nuevos tejidos vasculares de la raíz se conectan con los del tallo.

#### b) Divisiones basadas en el tratamiento y la respuesta

1- inducción de la rizogénesis, con acumulación de auxina en la zona de formación de raíces, pero todavía sin división celular;

2- iniciación, respondiendo a la inducción con las primeras divisiones celulares y con la organización de las nuevas células en primordios de raíz. En esta fase, aumenta la actividad IAA-oxidasa, empezando a descender la concentración de auxina;

3- crecimiento de los primordios radicales, que precisa de un descenso del nivel de auxina.

Describimos más detalladamente estas fases haciendo notar que la formación de diferentes raíces no es sincrónica, pudiendo presentarse al mismo tiempo diferentes grados de desarrollo en la misma microestaquilla.

#### Inducción

La inducción comienza con la formación de la microestaquilla produciendo un corte basal que la separa de la planta madre. Este corte produce una herida que induce la acumulación de o-dihidroxifenoles (Moncousin, 1991), que evitan la destrucción de la auxina por la acción de la IAA-oxidasa y que estimulan su biosíntesis. Paralelamente, se produce una síntesis de etileno a causa de la herida. La auxina se acumula en la base por el transporte basípeto de las auxinas endógenas desde las hojas y yemas, y por la auxina exógena que se aplica con el medio de cultivo. La aplicación de IBA, una auxina sintética, resulta ser más eficaz, ya que induce la misma acumulación de auxina que con el IAA, pero produciendo más raíces (Van der Krieken *et al.*, 1992), observando que parte del IBA se convierte en IAA.

Un pico de auxina se forma a las pocas horas del tratamiento inductor, pero no se encuentran diferencias entre patrones con diferente capacidad de enraizamiento (James, 1983 b), limitándose su actividad ya que más de un 95% de la auxina acumulada se conjuga inactivándose (Van der Krieken *et al.*, 1992).

El modo de acción de la auxina, es todavía desconocido, pero se ha sugerido que existe una interacción con alguna sustancia procedente del brote: Went, en los años 30 llamó "rizocalina" a la sustancia activa, y posteriormente se pensó que consistía en un complejo formado por la auxina, un o-dihidroxifenol procedente de las hojas y de las yemas y una polifenol-oxidasa (PPO) que oxida los o-difenoles a o-diquinonas (Bouillenne y Bouillenne-Walrand, 1955), y que, aunque parece estar presente en determinadas estaquillas convencionales de peral, no se confirma su efecto por la falta de acción positiva de los dihidroxifenoles *in vitro*.

Otro punto de vista se ha propuesto por el que las sustancias inductoras del enraizamiento actúen dañando las células a dosis subletales y de forma inespecífica (Wilson y Van Staden, 1990).

### Iniciación

Tras 1-2 días de inducción, algunas células en la región del floema inmediatamente adyacente al cambium o en los radios interfasciculares dilatan sus núcleos y reducen sus vacuolas, aumentando la densidad del citoplasma al microscopio y la concentración de proteínas, tomando las características de las células meristemáticas que comienzan a dividirse. El crecimiento posterior de la futura raíz estaría inhibido por la acción de la auxina (Torrey, 1956), pero ésta es degradada por la aparición de un pico de actividad peroxidasa (Gaspar *et al.*, 1992), cuyas isoenzimas catódicas actúan como IAA-oxidases.

Hacia los 4-7 días, las áreas morfogenéticas se organizan en meristemoides de raíz, que crecen atravesando el floema hacia el cortex. En este proceso, los gránulos de almidón desaparecen para proporcionar la energía necesaria. En algunos patrones, normalmente los más difíciles de enraizar, sólo la parte externa de las áreas morfogenéticas se organiza en meristemoides (Zhou *et al.*, 1992).

### Crecimiento

Durante la segunda y la tercera semana los primordios de raíz crecen y se alargan, desgarrando a su paso el cortex y la epidermis, emergiendo como raíces visibles. Al mismo tiempo se produce la conexión de los haces vasculares de la raíz y el tallo, posibilitando el transporte de nutrientes. El número de raíces final está limitado, ya que las primeras raíces

que se desarrollan inhiben el crecimiento de las demás (Moncousin, 1991), adaptándolo a las necesidades de la nueva planta.

El proceso de enraizamiento es muy complejo y está regulado por muchos factores, pero cuando falla, se detiene en fases muy concretas del proceso (Puente, 1996) en la fase inicial: la activación del cambium, para dar lugar a las primeras divisiones celulares (día 1), y la formación de nuevos meristemas, a partir de la organización de las nuevas células (remeristemización) y que darán lugar a los primordios de raíz (día 2). Sin embargo, cuando un primordio de raíz se forma, ya no se detiene y acaba formando una nueva raíz.

#### APLICACIÓN COMERCIAL DE LA MICROPROPAGACIÓN.

A pesar de que están descritos métodos para la micropropagación de numerosas variedades y patrones, sólo son aplicables comercialmente aquellas que son fiables, con resultados uniformes y repetibles y con una producción de planta muy elevada. Además será necesario que exista una demanda en el sector agrario que justifique la inversión inicial.

Pero existen problemas en la aplicación de una técnica en un laboratorio diferente al que la ha desarrollado, dando resultados muy diferentes sin causas aparentes, pero que pueden ser debidas a uno o varios de estos factores:

- diferentes frascos de cultivo con distinta tasa de intercambio de gases,
- diferente intensidad de iluminación y de calidad espectral,
- diferente temperatura,
- diferente modo de preparación de medios cultivo, como en la disolución de sustancias y en la esterilización,
- diferencias en el material vegetal de partida, como el grado de juvenilidad.

La aplicación comercial debe realizarse por medio de una gestión a tres niveles, aparte de la gestión comercial:

- Gestión de la investigación. Capaz de proporcionar una técnica fiable, repetible, y que produzca masivamente plantas de las que el 99% sean útiles y que el 98% se aclimaten con éxito, para que los fallos no aumenten el precio por planta.

- Gestión de la producción de planta *in vitro*. Con un laboratorio de micropropagación bien dotado que realice una planificación de la producción con arreglo a objetivos (pedidos) y que tenga flexibilidad para resolver los problemas imprevistos.

- Gestión de vivero. Para el manejo eficaz de las plantas producidas, durante los trasplantes a suelo, la aclimatación, la preparación de sustratos, la aplicación de riegos, de abonados, y de tratamientos para el control de infecciones.

## PERSPECTIVAS

La aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* a la mejora de frutales ha dado resultados que, aunque son menos espectaculares que en el caso de otras plantas herbáceas utilizadas como plantas-modelo, son muy esperanzadores respecto a la posibilidad de una efectiva aceleración de los procesos de mejora. El hecho de que se hayan vencido, en ciertos casos, las dificultades inherentes a las plantas leñosas, no solo en la lentitud de respuesta, sino también en el carácter más o menos recalcitrante de sus cultivos respecto a la regeneración de nuevas plantas a partir de los más variados tipos de tejidos, indica que podrán realizarse con frutales las mismas técnicas desarrolladas en *Nicotiana* o *Arabidopsis*, y que incluyen, numerosos ejemplos la obtención de híbridos somáticos por fusión de protoplastos de plantas de orígenes alejados, los haploides y dihaploides a partir de microsporas, los triploides y diferentes ploidías por rescate de embriones de semillas que abortarían por venir de cruzamientos entre especies alejadas, la fertilización *in vitro* venciendo las barreras naturales, la introducción de genes extraños o transformación genética, el aprovechamiento de la variación somaclonal mediante la selección *in vitro*, bien para factores bióticos con la obtención de plantas resistentes a enfermedades, bien para la tolerancia a factores abióticos como la salinidad, sequía, o las deficiencias nutricionales, con la regeneración de plantas a partir de las células y tejidos sometidos a presión de selección y el desarrollo de tests de determinación *in vitro* de la tolerancia. Pero sin olvidar la que ha proporcionado más resultados y que ha sido aplicada a la casi totalidad de las plantas de interés: la micropropagación, técnica que sustenta a las demás por permitir la obtención

de numerosas plantas clonales de los individuos resultantes de selección o manipulación.

En las especies frutales, con larga tradición de utilización de técnicas poco costosas, como el estaquillado leñoso, la micropropagación sólo ha encontrado una aplicación comercial de interés en aquellos casos en los que se producía una gran demanda de plantas (patrones) junto a cierto grado de dificultad en la propagación por técnicas tradicionales. Aunque la utilización de la micropropagación en pequeños laboratorios siempre puede justificarse por el gran interés como herramienta de investigación en fisiología vegetal y mejora genética, el futuro de la micropropagación como aplicación comercial solo será posible si se desarrollan técnicas de automatización y robótica que abaraten costes y que hagan competitiva la técnica frente a las tradicionales, menos tecnificadas. Un nuevo campo se abre con la producción de semillas sintéticas (Gray y Purohit, 1991), a partir de embriogénesis somática, en los casos en los que se asegura una propagación conforme al tipo, ya que es el método de propagación clonal más eficiente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bollmark, M.; Eliasson, L. 1990. Ethylene accelerates the breakdown of cytokinins and thereby stimulates rooting in Norway spruce hypocotyl cuttings. *Physiol. Plant.* 80: 534-540.
- Bouillenne, R.; Bouillenne-Walrand, M. 1955. Auxines et bouturage. Rpt. 14th Inter. Hort. Cong. 1: 231-238.
- Boxus, P. 1984. Assainissement des arbres fruitiers et du fraiser par culture de méristèmes. *Parasitica* 40: 139-155.
- Bressan, P.H.; Kim, Y.J.; Hyndman, S.E.; Hasegawa, P.M.; Bressan, R.A. 1982. Factors affecting *in vitro* rooting of rose. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 107: 979-990.
- Cohen, D. & Bhojwani, S.S. 1980. Micropropagation of fruit trees. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30: 142-144.
- De Klerk, G.J.; Ter Brugge, J. 1992. Factors affecting adventitious root formation in microcuttings of *Malus*. *Agronomie* 12:747-755.
- Debergh, P.C.; Zimmerman, R.H. (Eds.) 1991. *Micropropagation. Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 484 pp.
- Dolcet-Sanjuan, R.; Mok, W.S.; Mok, M.C. 1990. Micropropagation of *Pyrus* and *Cydonia* and their responses to Fe-limiting conditions. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 21: 191-199.
- Druart, P.; Kevers, C.; Boxus, P.; Gaspar, T. 1982. *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. *Z. Pflanzenphysiol.* 108: 429-436
- Gaspar, T.; Kevers, C.; Hausman, J.F.; Berthon, J.Y.; Ripetti, V. 1992. Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. *Agronomie* 12: 757-765.
- Gray, D.J.; Mortensen, J.A.; Benton, C.M.; Durham, R.E.; Moore, G.A. 1990. Ovule culture to obtain progeny from hybrid seedless bunch grapes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 115: 1019-1024.
- Gray, D.J.; Purohit, A. 1991. Embryogenesis and development of synthetic seed technology. *Critical Rev. in Plant Sci.* 10: 33-61

- Hammerschlag, F.A. 1988. Screening peaches *in vitro* for resistance to *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. J. Am. Soc. Hort. Sci. 111: 164-166.
- Harbage, J.F.; Stimart, D.P. 1996. Effect of pH and 1H-indole-3-butyric acid (IBA) on rooting of apple microcuttings. J. Am. Soc. Hort. Sci. 121: 1049-1053.
- Hormaza, J.I.; Dollo, L.; Polito V. 1994. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. Theor. Appl. Gen. 89: 9-13.
- Hutchinson, J.F. 1984. Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of apple "Northern Spy". Scientia Hort. 22: 347-358.
- James, D.J. 1983 a. Adventitious root formation '*in vitro*' in apple rootstocks (*Malus pumila*). I. Factors affecting the length of the auxin-sensitive phase in M.9. Physiol. Plant. 57: 149-153.
- James, D.J. 1983 b. Adventitious root formation '*in vitro*' in apple rootstocks (*Malus pumila*). II. Uptake and distribution of Indol-3yl-acetic acid during the auxin-sensitive phase in M.9 and M.26. Physiol. Plant. 57: 154-158.
- James, D.J.; Passey, A.J.; Barbara, D.J.; Bevan, M.W. 1989. Genetic transformation of apple (*Malus pumilla* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. Plant Cell Rep. 7: 658-661.
- Janick, J. 1992. Introduction. En: Biotechnology of Perennial Fruit Crops. F.A. Hammerschlag y R.E. Litz (Eds). CAB International. Walingford.
- Jarvis, B.C. 1986. Endogenous control of adventitious rooting in non-woody cuttings. En: New root formation in plants and cuttings. Jackson, M.B. (Ed.) Martinus Nijdorf Publishers. Dordrecht, pp. 191-222.
- Jarvis, B.C.; Yasmin, S.; Ali, A.H.L.; Hunt, R. 1984. The interaction between auxin and boron in adventitious root development. New Phytol. 97: 197-204.
- Jones, O.P.; Hatfield, S.G.S. 1976. Root initiation in apple shoots cultured *in vitro* with auxins and phenolic compounds. J. Hort. Sci. 51: 495-499.
- Lane, W.D.; McDougald, J.M. 1982. Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin. Can J. Plant Sci. 62: 689-694.
- Lloyd, G.; McCown, B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Proc Int. Plant Propag. Soc. 30:421-427.



- Marín, J.A.; Gella, R.; Herrero, M. 1988. Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. *Ann. Bot.* 62: 663-670.
- Miller, C.O.; Skoog, F. 1953. Chemical control of bud formation in tobacco stem segments. *Am. J. Bot.* 40: 768-773.
- Moncousin, C. 1991. Rooting of *in vitro* cuttings. En: *Biotechnology in agriculture and forestry, 17. High-tech and micropropagation*, I. Bajaj Y.P.S. (Ed.). Springer-Verlag. Berlin, pp. 231-261.
- Moore, G.A.; Durham, R.E. 1992. Molecular markers. En: *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. F.A. Hammerschlag y R.E. Litz (Eds). CAB International. Walingford.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.
- Murashige, T.; Bitters, W.P.; Rangan, T.S.; Nauer, E.M.; Roistacher, C.N.; Holliday, P.B. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free *Citrus* clones. *HortScience* 7: 118.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Navatel, J.C.; Bourrain, L. 1994. Influence of the physical structure of the medium on *in vitro* rooting. *Advances in Horticultural Science* 8: 57-59.
- Nissen, S.J.; Sutter, E.G. 1990. Stability of IAA and IBA in nutrient medium to several tissue culture procedures. *HortScience* 25: 800-802.
- Nyborn, H.; Rogstad, S.H.; Schaal, B.A. 1990. Genetic variation detected by the use of the M13 'DNA fingerprint' probe in *Malus*, *Prunus* and *Rubus* (*Rosaceae*). *Theor. Appl. Gen.* 79: 153-156.
- Ochatt, S.J.; Patat-Ochatt, E.M.; Rech, E.L.; Davey, M.R.; Power, J.B. 1989. Somatic hybridization of sexually incompatible top-fruit tree rootstocks, wild pear (*Pyrus communis* var. *pyraster* L.) and Colt cherry (*Prunus avium* x *pseudocerasus*) *Theor. Appl. Gen.* 78: 35-41.
- Pawlicki, N.; Welander, M. 1992. The effects of benzyladenine and gibberellic acid on adventitious root formation in apple stem discs. *Agronomie* 12: 783-788.

- Pierik, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Mundi Prensa. Madrid. 326 pp.
- Pierik, R.L.M.; Steegmans, H.H.M. 1975. Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of *Rhododendron*. *Scientia Hort.* 3: 1-20.
- Pua, E.C.; Chong, C. 1984. Requirement for sorbitol (D-glucitol) as carbon source for *in vitro* propagation of *Malus robusta* No. 5. *Can. J. Bot.* 62: 1545-1549.
- Puente, J. 1996. El enraizamiento *in vitro* del manzano. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. 184 pp.
- Puente, J.; Marin, J.A. 1994. Enraizamiento *in vitro* de árboles frutales. *Hortofruticultura* 5:46-52.
- Quoirin, M.; Lepoivre, P. 1977. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Hort.* 78: 437-442.
- Ramming, D.W. 1990. The use of embryo culture in fruit breeding. *HortScience* 25: 393-398.
- Rossi, F.; Baraldi, R.; Facini, O.; Lercari, B. 1993. Photomorphogenic effects on *in vitro* rooting of *Prunus* rootstock GF 655-2. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 145-151
- Rugini, E.; Luppino, M.; Grego, S.; Agazio, M. 1992. Endogenous polyamine and root morphogenesis variations under different treatments in cuttings and in *in vitro* explants of olive. *Acta Hort.* 300: 225-232.
- Sriskandarajah, S.; Mullins, M.G. 1981. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation *in vitro*. *J. Hort. Sci.* 56: 71-76.
- Stein, A.; Spiegel, S.; Faingersh, G.; Levy, S. 1991. Responses of micropropagated peach cultivars to thermotherapy for elimination of *Prunus* necrotic ringspot virus. *Ann. Appl. Biol.* 119: 265-271.
- Torrey, J.G. 1956. Physiology of root elongation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 7: 237-266.
- Van der Krieken, W.M.; Breteler, H.; Visser, M.H.M. 1992. The effect of the conversion of indolebutyric acid into indoleacetic acid on root formation on microcuttings of *Malus*. *Plant Cell Physiol.* 33: 709-713
- Vasil, I.K. (Ed.) 1991. Scale-up and Automation in Plant Propagation. Cell culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 8. Academic Press, San Diego. 267 pp.

- Webster, AD. 1995. Temperate fruit tree rootstock propagation. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 23: 355-372.
- Webster, C.A.; Jones, O.P. 1989. Micropropagation of the apple rootstock M.9: effect of sustained subculture on apparent rejuvenation *in vitro*. *J. Hort. Sci.* 64: 421-428.
- Webster, CA; Jones, OP. 1989. Micropropagation of the apple rootstock M.9: effect of substained sub-culture on apparent rejuvenation *in vitro*. *J. Hort. Sci.* 64: 421-428.
- Webster, CA; Jones, OP. 1992. Performance of field hedge and stoolbed plants of micropropagated dwarfing apple rootstock clones with different degrees of apparent rejuvenation. *J. Hort. Sci.* 67:521-528.
- Welander, M.; Huntrieser, I. 1981. The rooting ability of shoots raised "*in vitro*" from the apple rootstock A2 in juvenile and adult growth phase. *Physiol. Plant.* 53: 301-306.
- Wilson, P.J.; Van Staden, J. 1990. Rhizocaline, rooting co-factors, and the concept of promoters and inhibitors of adventitious rooting - A review. *Ann. Bot.* 66: 479-490.
- Zhou, J.; Wu, H.; Collet, G.F. 1992. Histological study of initiation and development *in vitro* of adventitious roots in minicuttings of apple rootstocks of M.26 and EMLA 9. *Physiol. Plant.* 84: 433-440.
- Zimmerman, R.H. 1984. Rooting apple cultivars *in vitro*. Interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 3: 301-311.
- Zimmerman, R.H; Broome, O.C. 1981. Phloroglucinol and *in vitro* rooting of apple cultivar cuttings. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 106: 648-652.
- Zimmerman, RH; Steffens, GL. 1995. Cultivar, planting density, and plant growth regulator effects on growth and fruiting of tissue cultured apple trees. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120: 183-193.